

SCN5A プロモーター領域の rare variant と不整脈症候群の関連

八木原伸江* 渡部 裕 南野 徹

心筋の主要なナトリウムチャネルの遺伝子である *SCN5A* の変異は種々の不整脈の原因となる。*SCN5A* の発現量の変化が不整脈基盤形成に関与する可能性があるが、*SCN5A* のプロモーター領域や調節領域の variant が不整脈発症に関与するのかは不明であった。今回われわれは、種々の不整脈症例 1298 例に対し、*SCN5A* のプロモーター領域と調節領域の遺伝子解析を行い、29 例に 26 種類の新規の *SCN5A* プロモーターの rare variant を同定した¹⁾。クロマチン免疫沈降シークエンスのデータと、今回同定された variant を比較すると、多数の rare variant は転写因子結合部位に位置していた。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて機能解析を行った結果、rare variant は野生型に比しプロモーター活性が低下していた。また、イントロン 1 に存在する調節領域内に、心房細動と関連する variant を同定した。以上の結果より、*SCN5A* の転写量の変化が種々の不整脈発症に関与する可能性が示唆された。

(心電図, 2019 ; 39 : 261~272)

I. はじめに

電位依存性ナトリウムチャネルは、心筋の活動電位の発生や興奮の伝播にかかわっている。心筋の主要なナトリウムチャネルの α サブユニットをコードす

る *SCN5A* 遺伝子の変異は種々の不整脈の原因となり、これらの病態は「心臓ナトリウムチャネルopathy」と総称される^{2)~9)}。*SCN5A* の機能獲得型変異は活動電位のプラトー相のナトリウム電流を増加させ、QT 延長症候群(3型)の原因となる¹⁰⁾。一方、機能喪失型の *SCN5A* の変異はナトリウム電流を減少させ、様々な不整脈(Brugada 症候群, 早期再分極症候群, 特発性心室細動, 心臓伝導障害, 洞不全症候群, 心房静止)の原因となることが知られている^{4), 7), 11), 12)}。また、機能獲得型および機能喪失型のいずれの変異も心房細動の原因となる^{10), 13)}。さらに、ナトリウムチャネルのほかのサブユニットや

Keywords

- *SCN5A*
- プロモーター
- 調節領域
- 不整脈

1 新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科学
(〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通1番町754番地)
*は責任者を示す

Rare Variants in the SCN5A Promoter and Conserved Noncoding Sequence Associated with Various Arrhythmias
Nobue Yagihara, Hiroshi Watanabe, Tohru Minamino

2019年1月22日 原稿受領 / 2019年2月21日 掲載承認

修飾タンパクなどの遺伝子の変異も、不整脈の原因となることが知られている^{14)~16)}。しかし、ナトリウムチャネルの異常を原因とするこれらの不整脈に罹患した症例に対し、遺伝子検査を施行してもSCN5Aの変異が同定されないことは稀ではない。これらの不整脈の多くはナトリウム電流の減少を原因とすることから、SCN5Aの調節領域のvariantは、ナトリウムチャネルの発現量を減少させることにより、不整脈基盤を形成する可能性があることが推測される。

SCN5Aのコアプロモーターは、非翻訳配列であるエクソン1を含む約2.8 kbpの領域である¹⁷⁾。また、SCN5Aのイントロン1に含まれる、複数の種の間でよく保存された塩基配列である conserved noncoding sequence (CNS) のなかには、SCN5Aのプロモーター活性と心筋の伝導を調節している部位があることが知られている¹⁸⁾。SCN5Aプロモーター領域の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)は転写活性を変化させることが知られている。また、SCN5Aの機能喪失型変異を有する家系において、2種類のSNPを含むSCN5Aプロモーターのハプロタイプが、伝導障害および心室不整脈の重症度と関連することが報告されている¹⁹⁾。さらに、ゲノムワイド関連解析で、心臓の発生などに関与する転写因子の遺伝的な多様性により、SCN5Aの転写や心筋の伝導に変化が生じることが示された^{20)~22)}。今回われわれは、SCN5Aのプロモーター領域のvariantが不整脈の易罹患性にかかわるという仮説について検討したため、解説する¹⁾。

II. 対象症例

本研究は、SCN5Aのタンパク翻訳領域および隣接領域に変異を認めない1298例の不整脈症例(心房細動444例、洞不全症候群49例、心臓伝導障害133例、Brugada症候群583例、特発性心室細動83例、早期再分極症候群6例)を対象とした。114例のBrugada症候群および376例の心房細動症例が白色人種で、そのほかの808例は日本人症例であった。

これらの症例および816例の不整脈を有さない対照群(日本人534例、白色人種282例)において、SCN5Aのプロモーター領域および調節領域の遺伝子解析を施行した。

本研究は各参加施設の倫理委員会の承認を得ており、すべての患者より書面による同意を得た。

III. 遺伝子検査

患者の末梢血を採取し、白血球よりゲノムDNAを抽出した。SCN5Aのプロモーター領域およびCNS領域の遺伝子検査をサンガー法にて施行した。得られたvariantの結果は、対照群、1000人ゲノムプロジェクト、Tohoku Megabank Whole Genome データ、dbSNPのデータと比較し、同一のものは除外した。

1. クロマチン免疫沈降シーケンス

本研究で同定されたプロモーター領域のvariantを、以前施行したマウスゲノムを用いたクロマチン免疫沈降シーケンスで得られた転写因子(Tbx3, Tbx5, Nkx2.5)や転写調節因子(p300), RNAポリメラーゼIIなどの結合部位や、H3K4me3などの転写活性マーカー領域の部位と比較した。ヒトゲノムの配列はhg18を用いた。

2. Rare variantの機能解析

ヒトSCN5Aのプロモーター配列の全長をpGL3-Basicプラスミド(Promega)でクローニングし、同定されたvariantのうち6種類の変異型プロモーター配列を含むプラスミドを、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて作成した。作成した野生型および変異型のSCN5Aプロモーター配列のプラスミドを用い、Human embryonic kidney 細胞(HEK293細胞)、Chinese hamster ovary 細胞(CHO細胞)、マウス心房筋細胞株であるHL-1細胞にそれぞれ遺伝子導入した。また、CNSによるプロモーター活性への影響を検討するため、SV40プロモーターとともに野生型および変異型のCNS配列を含むpGL3プラスミドを用いてCHO細胞に遺伝子導入し、プロモーター活性を測定した。さらに、CNS28

の variant が転写因子結合部位に存在するか否かを M-SCAN アルゴリズム (<http://www.-cisreg.ca/cgi-bin/mscan/MSCAN>) を用いて予測した。推定される転写因子結合部位のシーケンスを含む CNS28 のプローブを作成し、ゲルシフトアッセイにてヒト心筋核抽出物との親和性を測定した。

3. 統計解析

得られた結果は、Mann-Whitney U 検定あるいは Fisher の正確確率検定を用いて解析を行った。解析には IBM 社製 SPSS version 20 を使用し、有意水準を 0.05 未満とした。結果は平均値 ± 標準偏差で示した。

IV. 結 果

29 例の不整脈症例 (心房細動 6 例, 洞不全症候群 1 例, 伝導障害 3 例, Brugada 症候群 14 例, 特発性心室細動 5 例) において, 26 種類の新規の *SCN5A* プロモーター領域の rare variant を同定した (表)。Rare variant が同定された症例は, 男性 23 例 (79%), 平均年齢 44 ± 20 歳であった。心房細動のうち 1 例は 2 種類の *SCN5A* プロモーターの rare variant を有していた。複数の症例において, 同一の rare variant (c.-225-849insTG は 3 例の Brugada 症候群症例, c.225-115G > T は 1 例の伝導障害症例と 1 例の Brugada 症候群症例) が同定された。また, *SCN5A* のプロモーター領域の rare variant を有する症例の 18 例 (62%) で伝導障害を, 3 例 (12%) で早期再分極を認めた。QT 時間の異常を有する症例はなかった。不整脈, 心臓突然死の家族歴を有する症例は 11 例 (37%) であった。Brugada 症候群に限ると, 日本人では 469 例中 14 例 (3%) で *SCN5A* のプロモーター領域の rare variant を認めたが, 白色人種では 114 例中 1 例も認められなかった (0%)。

マウスには *Scn5a* のプロモーター領域が 2 ヶ所存在するが, ヒトの *SCN5A* プロモーターはそのうちの 1 つと塩基配列の類似性が高い。今回同定された rare variant をマウスのゲノム上にマッピングし, クロマチン免疫沈降シーケンスで得られた心臓の

発生や維持に関与する転写因子等の結合部位と比較した (図 1)。同定された多くの rare variant は転写因子結合部位に存在しており, これらの rare variant が転写因子との結合能に異常をきたし, *SCN5A* の発現量を変化させる可能性が示唆された。

ルシフェラーゼレポーターアッセイの手法を用いて, 6 種類の rare variant (Brugada 症候群 3 例, 特発性心室細動 2 例, 伝導障害 1 例) について機能解析を行った。HEK293 細胞 (図 2A), HL-1 (図 2B) のいずれの培養細胞においても, 各 rare variant は野生型に比較しプロモーター活性が有意に低下していた。

イントロン 1 内に存在する CNS28 は, プロモーター活性を変化させ *SCN5A* の転写にも影響を与えることが知られている。心房細動の 405 例中 7 例において, CNS28 内に c.-53+15307G > A の variant を同定したが, 同 variant は 664 例の対照群では 1 例のみで同定されるにすぎなかった ($p = 0.006$)。この variant は, CNS28 内に 3 ヶ所存在する transcriptional enhancer factor 1 (TEF-1) 結合部位の 1 ヶ所に存在し, 同部位における TEF-1 結合能を変化させることが推測された (図 3A)。ゲルシフトアッセイにて, c.-53+15307G > A が存在する部位の野生型の塩基配列の CNS28 プローブとヒト心筋核抽出物を反応させると, バンドのシフトが観察された (図 3B)。さらに, この結合は抗 TEF-1 抗体により特異的に阻害されることから, 核内に存在する TEF-1 と野生型配列の CNS28 プローブが結合することが示された。また, ルシフェラーゼレポーターアッセイでは, 野生型に比し c.-53+15307G > A の変異型はプロモーター活性の低下を示した (図 3C)。

V. 考 察

今回, われわれは種々の不整脈症候群の症例において, *SCN5A* プロモーター領域の rare variant を同定した。また, クロマチン免疫沈降シーケンスの結果から, これらの rare variant の多くは転写因

表 SCN5A プロモーター領域に rare variant を同定された症例の臨床背景

No.	性別	発症年齢	疾患	Promoter variant	心電図異常	不整脈の家族歴	突然死の家族歴
1	M	39	心房細動	c.-225-1340G > T	PR延長	上室頻拍	無
2	F	28	心房細動	c.-225-1315G > T	無	心房細動	無
3	F	47	心房細動	c.-225-1161A > G, c.-53+241C > A	無	無	無
4	M	17	心房細動	c.-53+167G > T	無	心房細動	無
5	M	58	心房細動	c.-53+222G > A	右脚ブロック, PR延長	無	無
6	M	64	心房細動, 洞不全症候群	c.-53+175delA	無	心房細動, 洞不全症候群	無
7	F	62	洞不全症候群	c.-225-820T > C	無	無	無
8	M	21	Brugada症候群	c.-225-1763T > C	右脚ブロック	無	無
9	M	75	Brugada症候群	c.-225-1723C > T	右脚ブロック, 発作性心房細動	無	無
10	M	44	Brugada症候群	c.-225-1531C > T	無	無	有
11	F	54	Brugada症候群	c.-225-1467G > A	無	無	無
12	M	32	Brugada症候群	c.-225-866insTA	無	無	無
13	M	22	Brugada症候群	c.-225-688T > C	無	無	無
14	M	43	Brugada症候群	c.-225-587_-584 del CAGT	PR延長	無	有
15	M	38	Brugada症候群	c.-225-565T > C	下壁の早期再分極	無	無
16	M	39	Brugada症候群	c.-53+11G > A	右脚ブロック	無	有
17	M	67	Brugada症候群	c.-225-849insTG	右脚ブロック, 左脚前枝ブロック	無	有
18	M	54	Brugada症候群	c.-225-849insTG	心室内伝導障害, 下壁の早期再分極	無	無
19	M	34	Brugada症候群	c.-225-849insTG	右脚ブロック	無	有
20	M	67	Brugada症候群	c.-225-782_779delGTTT	右脚ブロック	無	無
21	M	57	Brugada症候群	c.-225-115G > T	無	無	無
22	M	71	心臓伝導障害	c.-53+147delG	PR延長	無	無
23	F	82	心臓伝導障害	c.-53+265_+269GGGTT	PR延長	無	無
24	F	9	心臓伝導障害	c.-225-115G > T	左脚ブロック	心臓伝導障害	無
25	M	41	特発性心室細動	c.-225-51_-42del CCGACCCCGC	右脚ブロック	無	無
26	M	26	特発性心室細動	c.-225-1052G > A	無	無	無
27	M	13	特発性心室細動	c.-225-1228A > G	右脚ブロック	無	無
28	M	15	特発性心室細動	c.-225-374 G > T	J点上昇	早期再分極症候群	有
29	M	61	特発性心室細動	c.-225-420G > C	PR延長	無	無

[文献1より引用改変]

子結合部位など、転写の調整に関与する部位に存在することが示唆され、プロモーターの機能解析では、野生型に比し rare variant のプロモーター活性は低下することが示された。これらの所見から、SCN5A プロモーター領域の rare variant による転

写活性の変化が、種々の不整脈発症の基盤となる可能性が示唆された。

ナトリウムチャンネルは、心房筋、心室筋、Purkinje 線維において、活動電位の発生と興奮の伝播に関与する。Royerらは、ヘテロ接合体の SCN5A ノックア

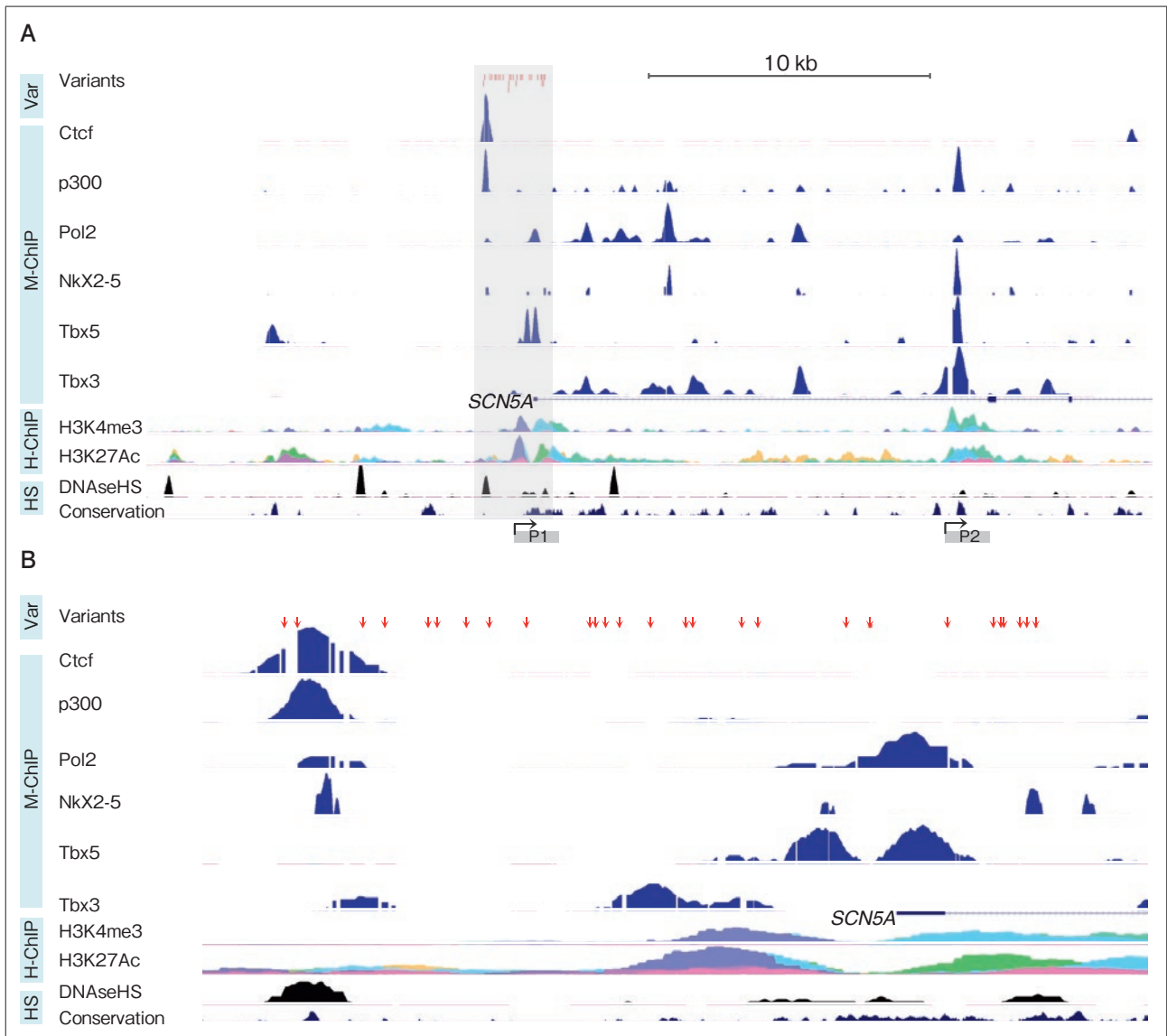


図1 SCN5A プロモーター領域

マウスの *SCN5A* 遺伝子座の免疫沈降クロマチンシークエンスの概要(A)と Aにおける P1 部位の拡大図(B)。今回同定された rare variant の位置を矢印で示す。各種転写因子(Ctcf, Pol2, p300, Nkx2-5, Tbx5, Tbx3)の結合部位をヒトゲノムの Hg18 の類似性の高い配列上に載せている。マウスのプロモーター領域は P1 および P2 で示している。

Var : variant の部位, M-ChIP : マウス心臓免疫沈降シークエンスデータ, H-ChIP : ヒト心臓免疫沈降シークエンスデータ

[文献1より引用改変]

ウトマウスを作成し、その表現型を検討している²³⁾。ヘテロ接合体ノックアウトマウスでは、加齢とともに P 波、PR 時間、QRS 幅の延長が認められ、ナトリウム電流の減少が伝導障害に関与することが示されている。また、以前より心臓伝導障害の 30~50% の症

例では遺伝性が認められることが知られている。Pfeufer らは、ゲノムワイド関連解析により、PR 時間と最も強く関連するシグナルが *SCN5A* とそれに隣接する *SCN10A* の遺伝子座に位置すると報告している²²⁾。Smith らは、アフリカ系アメリカ人約 6000 人

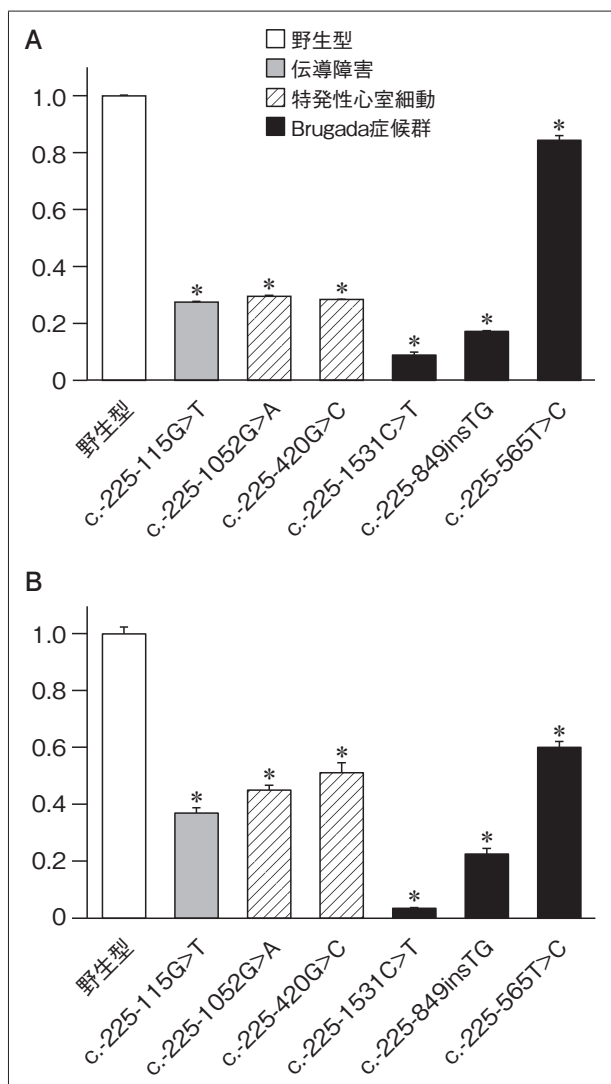


図2 SCN5A プロモーター領域の variant のプロモーター活性の比較

HEK293細胞でのプロモーター活性(A)とHL-1細胞でのプロモーター活性(B)。いずれの細胞でも、variant (n = 4)は野生型 (n = 8)に比べプロモーター活性は低下している。

*p < 0.01 vs. 野生型プロモーター活性

[文献1より引用改変]

を対象にゲノムワイド関連解析を施行し、PR時間と最も強い相関を示すシグナルをSCN5AおよびSCN10Aの遺伝子座に同定している²⁴⁾。今回、われわれの研究において、伝導障害以外に心電図異常を認めない症例においてもSCN5Aのプロモーターのvariantが同定されており、これらの先行研究の結果

と矛盾しない。さらに、今回 rare variantが同定された症例の62%において伝導異常が認められており、プロモーター活性の変化によるナトリウムチャネルの発現量の変化が、心臓の伝導に大きな影響を与えると考えられた。

ナトリウムチャネルの機能不全は、Brugada症候群の最も重要な機序の一つである。本疾患の原因遺伝子として、ナトリウムチャネル遺伝子(α サブユニットをコードするSCN5A, β サブユニットをコードするSCN1B, SCN2B, SCN3Bなど)や、ナトリウムチャネルのパートナー遺伝子(GPD1L, MOG1, SLMAP, PKP2)が知られている^{11), 14), 25)~31)}。今回の研究では、SCN5Aプロモーター領域のvariantは、ナトリウムチャネルの発現量を低下させ、ナトリウム電流を減少させることによって、Brugada症候群の原因となりうることを示された。今回われわれは、日本人および欧州の白色人種のBrugada症候群に対し、SCN5Aプロモーター領域のスクリーニングを行ったが、rare variantが同定されたのは日本人症例のみであった。Brugada症候群の有病率はほかの地域に比べ、アジア諸国で高いことが知られており、今回の結果はその理由の一端を説明できるものと考えられる^{5), 32)}。

通常、遺伝子解析は、タンパク翻訳領域のアミノ酸置換を伴う変異およびエクソンに隣接するイントロンの変異をターゲットとしているが、ナトリウムチャネルの機能喪失が原因と疑われる不整脈症例でも、これらの領域に変異が同定されないことは少なくない。近年、全ゲノムの80%の領域、特にタンパク翻訳領域以外の配列も何らかの機能を有するとされている^{19), 33)}。近年、SCN5Aのプロモーター領域による心筋の活動電位への影響や不整脈への関与についての報告が増えている。Bezzinaらは、アジア人に多いSCN5AプロモーターのハプロタイプがSCN5Aの転写に影響し、健常人においてPR時間、QRS幅を延長させ、また、Brugada症候群症例においては、このハプロタイプがナトリウムチャネル遮断薬による伝導遅延をより顕性化させたと報告し

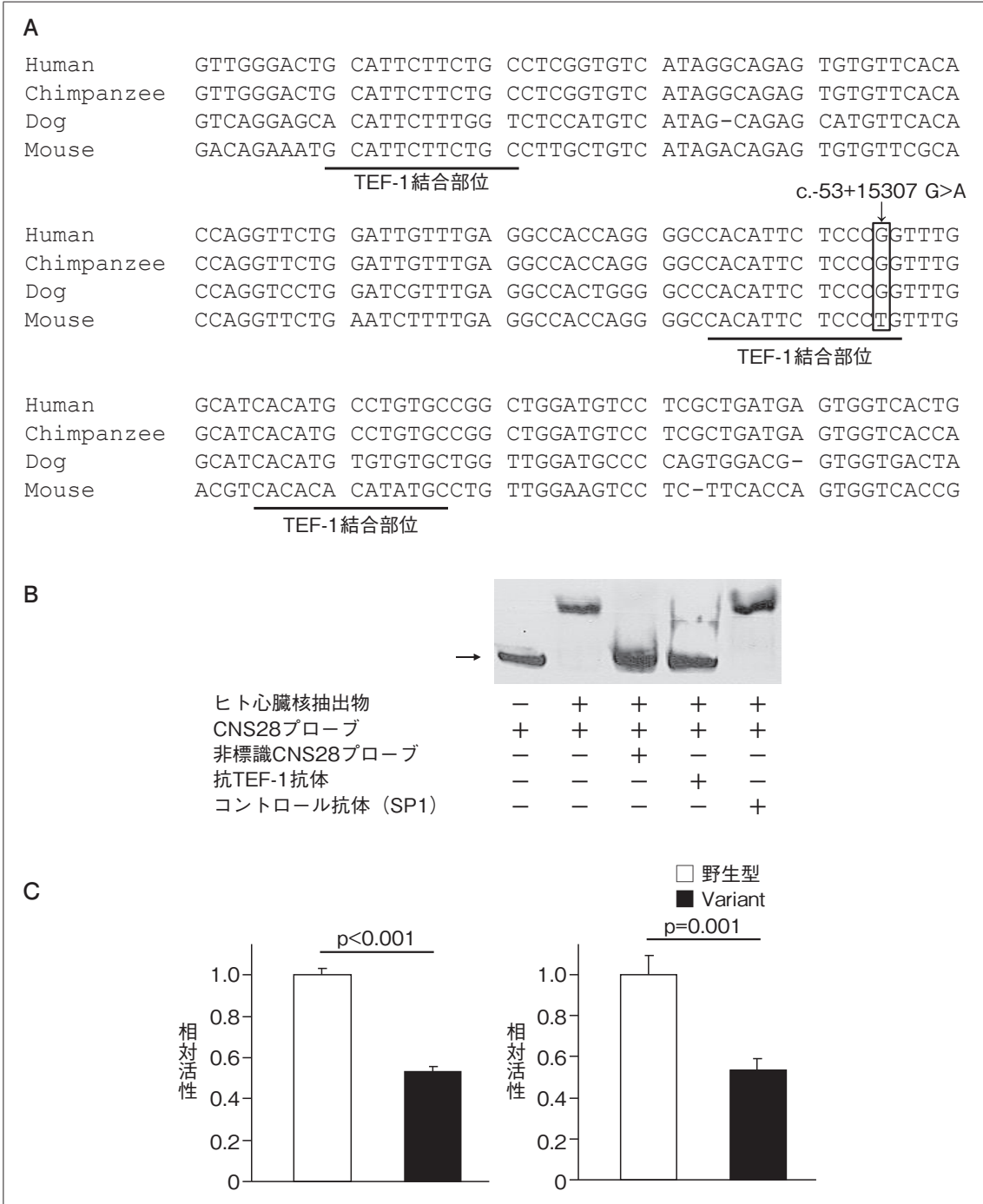


図3 心房細動と関連する *SCN5A* のイントロン1内の conserved noncoding sequence 28 (CNS28) の variant と *SCN5A* の転写との関連

A: CNS28内に3カ所存在する transcriptional enhancer factor 1(TEF-1)予測結合部位。
 B: ゲルシフトアッセイを用いた CNS28プローブとヒト心臓核抽出タンパクとの反応。この結合は抗 TEF-1抗体により阻害される。
 C: Chinese hamster ovary細胞(左), HL-1細胞(右)でのプロモーター活性の検討。Variant (n = 4)の配列を含む CNS28は、野生型(n = 4)の配列と比べプロモーター活性を低下させた。

[文献1より引用改変]

ている³³⁾。また、伝導障害と心室不整脈や突然死を合併した家系における遺伝子解析で、*SCN5A*のフレームシフト変異が同定されたが、この変異は*SCN5A*プロモーターの2種類のSNPと連鎖しており、この2つのSNPのヘテロ接合の症例では1度房室ブロックや心室内伝導障害、右脚ブロックなどの軽度の心電図異常をきたすのみであったが、ホモ接合の症例ではBrugada症候群や失神、突然死などの重症の表現型を呈していた¹⁹⁾。

Tarradasらは、*SCN5A*の転写の調節に転写因子のGATA4が重要な役割を担うと報告している³⁴⁾。*SCN5A*のプロモーター領域内にはGATA転写因子群の結合配列が複数存在すると予測され、クロマチン免疫沈降では、GATA4、GATA5はプロモーター領域内の予測結合部位の2カ所に結合していると考えられた。RNA干渉の手法を用いて、ラット心臓に由来するH9c2培養細胞でのGATA4の発現を80~90%抑制すると、*Scn5a*の発現が40~50%程度に減少し、また、GATA4とGATA5は相乗的に*SCN5A*のプロモーター活性を増強した。さらに、*SCN5A*プロモーター領域のGATA転写因子結合部位の塩基配列に変異を導入することにより、GATA4のみ、あるいはGATA4とGATA5の*SCN5A*のプロモーター活性への相乗効果は減少した。アフリカツメガエルの卵細胞に*SCN5A*の遺伝子を導入し、パッチクランプ法によりナトリウム電流を測定すると、*SCN5A*の発現量とナトリウム電流は正の相関を示した。また、GATA4と*SCN5A*の各々の発現量には正の相関を認められたが、GATA5あるいはGATA6と*SCN5A*の発現量の間には相関は見られなかった。*SCN5A*の転写にはGATA4が関与しており、プロモーター領域にGATA4が結合することで、*SCN5A*の発現を調節している可能性が考えられた。

また、*SCN5A*の発現量はナトリウム電流の量に影響を与え、不整脈の発症にも影響を及ぼす可能性があると考えられる。Van den Boogaardらは、*SCN10A*の非翻訳領域のSNPが心臓での*SCN5A*の

発現に関与することを報告している³⁵⁾。このSNPは、*SCN5A*のプロモーターと協働して*SCN5A*の発現に関与するエンハンサーで、*SCN10A*のイントロン内に存在している。*SCN10A*のエンハンサーを除去した遺伝子改変マウスでは、刺激伝導系、心筋細胞のいずれにおいても、*SCN5A*とともに導入した β ガラクトシダーゼの機能不全を認め、*SCN5A*の発現が低下していると推測された。また、ヒト心臓サンプルにおける*SCN5A*の発現量とこのSNPの遺伝子型を比較すると、major alleleのホモ接合型の症例は、minor alleleを有する症例に比し*SCN5A*の発現量が多かった。いずれの遺伝子型の症例においても、心臓では*SCN10A*はほとんど発現しておらず、*SCN5A*の発現への作用は、*SCN10A*チャンネルのタンパクによるものではなく、エンハンサーとしての機能によるものと考えられる。

このように*SCN5A*のプロモーターへ結合する転写因子が明らかとなってきており、プロモーター領域の結合部位の塩基配列の変異や、エンハンサー領域の変異により*SCN5A*の転写が抑制される可能性が示されている。今回われわれが同定したrare variantが不整脈基盤を形成する可能性があることを支持するものである。

本研究において、種々の不整脈症候群の症例において*SCN5A*プロモーターのvariantが同定された。*SCN5A*プロモーターのvariantは、単独では不整脈発症の原因とはならないかもしれないが、不整脈発症に関する遺伝的感受性を高める可能性があり、非翻訳領域の不整脈発症への影響に関しては、今後の研究が待たれる。

謝辞

本総説作成に当たり、蒔田直昌先生、Dan M. Roden先生、堀江稔先生、清水渉先生、大野聖子先生、長谷川奏恵先生、桑野良三先生、中野由紀子先生、相庭武司先生、宮本恵宏先生、鎌倉士郎先生、重水大智先生、田中敏弘先生、角田龍彦先生、須田将吉先生、佐藤光希先生、遠藤直人先生、Phil

Barnett 先生, Laetitia Duboscq-Bidot 先生, Atack C. Thomas 先生, Ping Yang 先生, Stéphanie Chatel 先生, Richard Redon 先生, Jean-Jacques Schott 先生, Vincent Probst 先生, Tamara T. Koopmann 先生, Connie R. Bezzina 先生, Arthur A.M. Wilde 先生, Dawood Darbar 先生, Brian S. Donahue 先生より多大なるご協力をいただきましたことを深謝いたします。

付記

本稿は、第22回日本不整脈心電学会学術奨励賞優秀賞を受賞した論文をもとに、総説としてまとめたものである。なお、図表については、受賞論文より引用改変し、掲載させていただいた。

受賞論文

Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, Duboscq-Bidot L, Thomas AC, Yang P, Ohno S, Hasegawa K, Kuwano R, Chatel S, Redon R, Schott JJ, Probst V, Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AA, Nakano Y, Aiba T, Miyamoto Y, Kamakura S, Darbar D, Donahue BS, Shigemizu D, Tanaka T, Tsunoda T, Suda M, Sato A, Minamino T, Endo N, Shimizu W, Horie M, Roden DM, Makita N : Variants in the SCN5A Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. *J Am Heart Assoc*, 2016 ; 5.pii : e003644. doi : 10.1161/JAHA.116.003644.

〔文 献〕

- 1) Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, Duboscq-Bidot L, Thomas AC, Yang P, Ohno S, Hasegawa K, Kuwano R, Chatel S, Redon R, Schott JJ, Probst V, Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AA, Nakano Y, Aiba T, Miyamoto Y, Kamakura S, Darbar D, Donahue BS, Shigemizu D, Tanaka T, Tsunoda T, Suda M, Sato A, Minamino T, Endo N, Shimizu W, Horie M, Roden DM, Makita N : Variants in the SCN5A Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. *J Am Heart Assoc*, 2016 ; 5(9). pii : e003644. doi : 10.1161/JAHA.116.003644.
- 2) Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr : Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, 1995 ; 376 : 683 ~ 685
- 3) Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT : SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 1995 ; 80 : 805 ~ 811
- 4) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q : Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 1998 ; 392 : 293 ~ 296
- 5) Alings M, Wilde A : "Brugada" syndrome : clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation*, 1999 ; 99 : 666 ~ 673
- 6) Balser JR : Sodium "channelopathies" and sudden death : must you be so sensitive? *Circulation research*, 1999 ; 85 : 872 ~ 874
- 7) Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N : Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011 ; 4 : 874 ~ 881
- 8) Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, Jr : Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*. 2003 ; 112 : 1019 ~ 1028
- 9) Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA : A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res*, 2003 ; 92 : 14 ~ 22
- 10) Makiyama T, Akao M, Shizuta S, Doi T, Nishiyama K, Oka Y, Ohno S, Nishio Y, Tsuji K, Itoh H, Kimura T, Kita T, Horie M : A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* : 2008 ; 52 : 1326 ~ 1334
- 11) Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, Nakazawa K, Kimura A, Hiraoka M : A

- novel *SCN5A* mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS letters*. 2000 ; 479 : 29 ~ 34
- 12) Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H : Cardiac conduction defects associate with mutations in *SCN5A*. *Nature genetics*, 1999 ; 23 : 20 ~ 21
 - 13) Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL, Jr., Roden DM : Cardiac sodium channel (*SCN5A*) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*, 2008 ; 117 : 1927 ~ 1935
 - 14) Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kaab S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR : Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest*, 2008 ; 118 : 2260 ~ 2268
 - 15) Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ : *SCN4B*-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 2007 ; 116 : 134 ~ 142
 - 16) Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, Jiramongkolchai K, Chopra S, Donahue BS, Kannankeril PJ and Roden DM. Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* : 2009 ; 2 : 268 ~ 275
 - 17) Yang P, Kupersmidt S, Roden DM : Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (*SCN5A*) promoter. *Cardiovasc Res*, 2004 ; 61 : 56 ~ 65
 - 18) Atack TC, Stroud DM, Watanabe H, Yang T, Hall L, Hipkens SB, Lowe JS, Leake B, Magnuson MA, Yang P, Roden DM : Informatic and functional approaches to identifying a regulatory region for the cardiac sodium channel. *Circ Res*, 2011 ; 109 : 38 ~ 46
 - 19) Park JK, Martin LJ, Zhang X, Jegga AG, Benson DW : Genetic variants in *SCN5A* promoter are associated with arrhythmia phenotype severity in patients with heterozygous loss-of-function mutation. *Heart rhythm*, 2012 ; 9 : 1090 ~ 1096
 - 20) Arnolds DE, Liu F, Fahrenbach JP, Kim GH, Schillinger KJ, Smemo S, McNally EM, Nobrega MA, Patel VV, Moskowitz IP : *TBX5* drives *Scn5a* expression to regulate cardiac conduction system function. *J Clin Invest*, 2012 ; 122 : 2509 ~ 2518
 - 21) Chambers JC, Zhao J, Terracciano CM, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R, Navaratnarajah M, Lotlikar A, Sehmi JS, Kooner MK, Deng G, Siedlecka U, Parasramka S, El-Hamamsy I, Wass MN, Dekker LR, de Jong JS, Sternberg MJ, McKenna W, Severs NJ, de Silva R, Wilde AA, Anand P, Yacoub M, Scott J, Elliott P, Wood JN, Kooner JS : Genetic variation in *SCN10A* influences cardiac conduction. *Nat Gene*, 2010 ; 42 : 149 ~ 152
 - 22) Pfeufer A, van Noord C, Marciante KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, Tarasov KV, Muller M, Sotoodehnia N, Sinner MF, Verwoert GC, Li M, Kao WH, Kottgen A, Coresh J, Bis JC, Psaty BM, Rice K, Rotter JI, Rivadeneira F, Hofman A, Kors JA, Stricker BH, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Beckmann BM, Sauter W, Gieger C, Lubitz SA, Newton-Cheh C, Wang TJ, Magnani JW, Schnabel RB, Chung MK, Barnard J, Smith JD, Van Wagoner DR, Vasani RS, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Launer LJ, Najjar SS, Lakatta E, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Muller-Myhsok B, Ehret GB, Boerwinkle E, Chakravarti A, Soliman EZ, Lunetta KL, Perz S, Wichmann HE, Meitinger T, Levy D, Gudnason V, Ellinor PT, Sanna S, Kaab S, Witteman JC, Alonso A, Benjamin EJ, Heckbert SR : Genome-wide association study of PR interval. *Nat Gene*, 2010 ; 42 : 153 ~ 159
 - 23) Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F : Mouse model of *SCN5A*-linked hereditary Lenegre's disease : age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*, 2005 ; 111 : 1738 ~ 1746
 - 24) Smith JG, Magnani JW, Palmer C, Meng YA, Soliman EZ, Musani SK, Kerr KF, Schnabel RB, Lubitz SA, Sotoodehnia N, Redline S, Pfeufer A, Muller M, Evans DS, Nalls MA, Liu Y, Newman AB, Zonderman AB, Evans MK, Deo R, Ellinor PT, Paltoo DN, Newton-Cheh C, Benjamin EJ, Mehra R, Alonso A, Heckbert SR and Fox ER. Genome-wide association studies of the PR interval in African Americans. *PLoS genetics*, 2011 ; 7 : e1001304.
 - 25) Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H : Novel *SCN5A* mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*, 2001 ; 104 : 3081 ~ 3086

- 26) Riuro H, Beltran-Alvarez P, Tarradas A, Selga E, Campuzano O, Verges M, Pagans S, Iglesias A, Brugada J, Brugada P, Vazquez FM, Perez GJ, Scornik FS, Brugada R : A missense mutation in the sodium channel beta2 subunit reveals *SCN2B* as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Hum Mutat*, 2013 ; 34 : 961 ~ 966
- 27) Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C : A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009 ; 2 : 270 ~ 278
- 28) London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC, Jr : Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (*GPD1-L*) decreases cardiac Na^+ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation*, 2007 ; 116 : 2260 ~ 2268
- 29) Kattynarath D, Maugenre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins RP, Fressart V, Berthet M, Schott JJ, Leenhardt A, Probst V, Le Marec H, Hainque B, Coulombe A, Hatem SN, Guicheney P : *MOG1* : a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011 ; 4 : 261 ~ 268
- 30) Ishikawa T, Sato A, Marcou CA, Tester DJ, Ackerman MJ, Crotti L, Schwartz PJ, On YK, Park JE, Nakamura K, Hiraoka M, Nakazawa K, Sakurada H, Arimura T, Makita N, Kimura A : A novel disease gene for Brugada syndrome : sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012 ; 5 : 1098 ~ 1107
- 31) Cerrone M, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H, Novelli V, Kim C, Tirasawadichai T, Judge DP, Rothenberg E, Chen HS, Napolitano C, Priori SG, Delmar M : Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*, 2014 ; 129 : 1092 ~ 1103
- 32) Berne P, Brugada J : Brugada syndrome 2012. *Circ J*, 2012 ; 76 : 1563 ~ 1571
- 33) Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, Koopmann TT, Tanck MW, Miyamoto Y, Kamakura S, Roden DM, Wilde AA : Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation*, 2006 ; 113 : 338 ~ 344
- 34) Tarradas A, Pinsach-Abuin ML, Mackintosh C, Llorca-Batlle O, Perez-Serra A, Batlle M, Perez-Villa F, Zimmer T, Garcia-Bassets I, Brugada R, Beltran-Alvarez P, Pagans S : Transcriptional regulation of the sodium channel gene (*SCN5A*) by GATA4 in human heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2017 ; 102 : 74 ~ 82
- 35) van den Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O, Arnolds DE, van de Werken HJ, Klous P, McKean D, Muehlschlegel JD, Moosmann J, Toka O, Yang XH, Koopmann TT, Adriaens ME, Bezzina CR, de Laat W, Seidman C, Seidman JG, Christoffels VM, Noreaga MA, Barnett P, Moskowitz IP : A common genetic variant within *SCN10A* modulates cardiac *SCN5A* expression. *J Clin Invest*, 2014 ; 124 : 1844 ~ 1852

Rare Variants in the *SCN5A* Promoter and Conserved Noncoding Sequence Associated with Various Arrhythmias

Nobue Yagihara, Hiroshi Watanabe, Tohru Minamino

Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Mutations in the coding sequence of *SCN5A* have been associated with various arrhythmias. However, it is unknown whether variants in the promoter and transcription regulatory regions of *SCN5A* modulate the risk of arrhythmias. We resequenced the promoter region of *SCN5A* in 1288 patients with various arrhythmia syndromes. We also resequenced the conserved noncoding sequences (CNS) in intron 1. We identified novel 26 variants in 29 patients. We performed luciferase-reporter assay to elucidate the functional change caused by the rare variants. Six variants revealed decreased promoter activity compared with wild-type sequence. ChIP-Seq analyses revealed that the majority of the promoter variants are located at the regions bound by the transcription factors or active histone marks. We also identified a rare variant in CNS28 in patients with atrial fibrillation. CNS28 includes 3 binding sites for TEF1, a muscle-specific transcription factor, and the variant was predicted to disrupt one of these binding sites. This variant was associated with decreased promoter activity. Variants in the promoter and the transcription regulatory region of *SCN5A* were identified in the patients with various arrhythmias, which supported the hypothesis that altered *SCN5A* transcription levels modulate susceptibility to arrhythmias.

Keywords : *SCN5A*, Promoter, Arrhythmia, Variant, Noncoding